

## مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه شیرین بیان در بهبود باروری موش های سوری مبتلا به هایپر آندروژنیسم ناشی از سندروم تخمدان پلی کیستیک تجربی ایجاد شده توسط لتروزول

عباس احمدی\*، مصطفی مصطفوی

گروه علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۸

### چکیده:

زمینه و هدف: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) شایع ترین اختلال غدد درون ریز در زنان می باشد. این سندرم با علائم افزایش هورمون های آندروژنی، عدم تخمک گذاری، ناباروری و چاقی مشخص می گردد. مهم ترین نشانه برای وجود تخمدان پلیسیستیک، افزایش آندروژن های خونی می باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان بر عوارض هایپر آندروژنیسم ایجاد شده توسط تخمدان پلی کیستیک تجربی بر توان باروری موش های سوری ماده می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، ۸۴ قطعه موش سوری به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه های کنترل، هایپر آندروژن، عصاره هیدروالکلی شیرین بیان در (تیمار ۱ mg/kg ۱۵۰)، (تیمار ۲ mg/kg ۳۰۰)، (تیمار ۳ mg/kg ۴۵۰) و تجویز شیرین بیان تنها با دوز mg/kg ۴۵۰ صورت گرفت. گروه های هایپر آندروژن و تیمار ۲۱ روز متوالی لتروزول با دوز mg/kg ۲ لتروزول از طریق خوراکی دریافت کردند. گروه های تیماری ۲ ساعت بعد عصاره شیرین بیان با دوزهای یاد شده از طریق خوراکی دریافت کردند. بعد از پایان دوره درمان از هر گروه ۱۰ قطعه موش به طور تصادفی برای انجام فرایند لقاح داخل آزمایشگاهی انتخاب شدند. در روند لقاح داخل آزمایشگاهی درصد اووسیت ها، میزان لقاح و رویان و بلاستوسیت و توقف آن ها بین گروه های مختلف مقایسه شد.

یافته ها: مقایسه نتایج در گروه های مختلف نشان داد که در گروه هایپر آندروژن عوامل باروری موش ها به شدت افت کرده و عصاره شیرین بیان توانسته اثرات محافظتی نسبی داشته باشد. این اثرات در گروه تیمار ۲ بیشتر بود.

نتیجه گیری: نهایتاً می توان نتیجه گرفت که اثرات سوء استفاده از لتروزول، پتانسیل کاهش توان باروری در جنس ماده را داشته و استفاده از عصاره هیدروالکلی شیرین بیان با دوز مناسب، به عنوان یک آنتی اکسیدان تا حدودی می تواند اثرات سوء هایپر آندروژنیسم ناشی از سندروم تخمدان پلی کیستیک بر توان باروری موش ماده را بهبود بخشد.

واژه های کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، توان باروری، هایپر آندروژنیسم، لتروزول، ریشه شیرین بیان.

### مقدمه:

زنان و مردان مشکلات متعددی در سطح دنیا دیده می شود (۱). اهمیت این سندرم از چندین جهت قابل توجه است: مهم ترین اختلال هورمونی است که زنان را درگیر می کند، به عنوان یک سندروم، علل متفاوت و ناشناخت های در بروز آن نقش دارند،

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) شایع ترین اختلال غدد درون ریز در زنان می باشد. این سندرم با علائم افزایش هورمون های آندروژنی، عدم تخمک گذاری، ناباروری و چاقی مشخص می گردد. امروزه با افزایش روز افزون ناباروری در

علائم بالینی و شدت آن در بیماران مختلف متفاوت است. البته مطالعات زیادی برای یافتن علل آن صورت پذیرفته است، اما همچنان چهره غامض خویش را حفظ کرده است (۲).

در مطالعه حاضر برای ایجاد سندروم، از افزایش آندروژن خون با تجویز لتروزول استفاده شد و درمان آن نیز بر اساس مطالعات و تحقیقات گذشته با یک داروی گیاهی در نظر گرفته شد که علاوه بر سابقه استفاده ۴ هزار ساله در ناباروری زنان، نحوه اثرات آن بر باروری همچنان مورد تحقیق است (۳). درمان متداول این سندروم با داروهای شیمیایی صورت می پذیرد. پزشکان بالینی در قدم اول استفاده از یک تحریک کننده انسولین مثل متفورمین یا پیوگلیتازون را ترجیح می دهند چرا که مقاومت به انسولین (در اکثر مبتلایان) یکی از علل یا نشانه های بالینی موجود در PCOS است (۴). برای تحریک تخمک گذاری استفاده از کلومیفن سترات یا یکی از اعضای خانواده مهارکننده آروماتاز مانند لتروزول برای کاهش میزان استروژن، در زنانی که با استفاده از داروهای آنتی آندروژن مثل اسپرونولاکتون دچار افزایش استرادیول خون هستند، استفاده می شود. گرچه خود اسپرونولاکتون هم به عنوان آنتی آندروژن در درمان سندروم تجویز می گردد (۵).

داروهای شیمیایی صرفاً با یک مکانیسم به مقابله با سندرمی چنین پروسعت می پردازند، لذا به نظر می رسد استفاده از داروهای گیاهی که حاوی چندین ماده موثره هستند، در دوز مناسب نتیجه بهتری در پی داشته باشد (۶). از سایر عصاره ها یا اسانس ها هم برای درمان این سندرم استفاده شده است. مثلاً رضوان فر و همکاران از ترکیب ۳ عصاره گیاهی و سلنیوم روی همین مدل هایپرآندروژنیسم اثرات درمانی موفقی به دست آورده اند (۷). استفاده از موم زنبور عسل در سندرم القا شده با استرادیول والرات در رت باعث کاهش چربی خون ناشی از افزایش آندروژن ها بوده است (۹)؛ همچنین استفاده

از داروهای سنتی چینی در زنان مبتلا به سندرم با مکانیسم های مختلفی علایم مربوط را بهبود بخشیده است (۱۰-۱۲،۸). Simons و همکاران خاصیت آنتاگونیستی گلابریدین و گلابرن موجود در عصاره شیرین بیان را روی گیرنده های استروژن در محیط داخل آزمایشگاهی نشان داده اند (۱۵-۱۳). یکی از متداول ترین روش های القای سندروم تخمدان پلی کستیک استفاده از لتروزول می باشد. لتروزول به عنوان یک داروی غیر استروئیدی نسل سوم مهارکننده آروماتاز در زنان یائسه مبتلا به سرطان سینه یا برای القای تخمک گذاری در زنان با استروژن بالا تجویز می شود (۱۶). لتروزول به صورت رقابتی به گروه هم آنزیم چسبیده و آن را اشغال می کند و در نتیجه آروماتاز توانایی تبدیل آندروژن ها به استروژن ها را ندارد. عمل اصلی این دارو با تداخل در ایزویم های CYP3A4 و CY2A6 است (۱۷،۱۸). از اثرات جانبی درمان با این دارو کاهش تراکم استخوانی و افزایش HDL و LDL می توان اشاره کرد (۱۹)؛ همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شده است که اثرات مخرب بر ارگانوژن جنین جوندگان داشته است (۲۰).

سابقه تاریخی ۲۵۰۰ ساله استفاده از شیرین بیان آن را به "پدربزرگ گیاهان دارویی" معروف کرده است. اصلی ترین مواد موثر شیرین بیان، گلاسیسیریزینک اسید (جزء ساپونین ها) و گلابریدین (جزء ایزوفلاونوئیدها) و Isoliquiritigenin (جزء فلاونوئیدها) می باشند (۲۱). ریشه شیرین بیان باعث کاهش تستسترون در زنان و مردان سالم می شود (۲۲-۲۴)؛ همچنین تخمک گذاری منظم و بارداری را در زنان نابارور با آندروژن بالا ایجاد کرده است (۲۵). گلابریدین و گلابرن که فیتواسترون می باشند با افزایش مصرف انرژی، افزایش حساسیت به انسولین و خاصیت آنتی اکسیدان باعث کاهش وزن می شوند (۲۶). گلابرن بیشتر از گلابریدین به گیرنده های استروژن انسانی می چسبد، به همین دلیل

در خاصیت آنتی اکسیدانی آن می باشند. دوم اینکه در سلول هایی مانند ماکروفاژها تجمع می یابد و از طریق کاهش فعالیت NADPH اکسیداز و افزایش گلوکاتیون سلولی (GSH)، باعث کاهش استرس اکسیداتیو سلولی می شود. عصاره ی شیرین بیان در تجویز موضعی خاصیت آنتی اکسیدان و از بین بردن رادیکال های آزاد را نشان داد و ممکن است، در تجویز موضعی برای محافظت پوست در برابر رادیکال های آزاد و انواع اکسیژن غیر فعال به کار رود (۲۱).

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سوء سندروم تخمدان پلی کیستیک تجربی ناشی از تجویز لتروزول و بررسی نقش عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان به عنوان یک آنتی اکسیدان بر توان باروری موش های سوری ماده است.

### روش بررسی:

در این تحقیق از موش های سوری ماده بالغ ۴-۶ هفته ای با وزن ۱۸-۲۰ گرم جهت ایجاد هایپرآندروژنیسم تجربی استفاده شده است. این حیوانات تحت شرایط ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و درجه حرارت  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد نگهداری شدند. موش ها هر روز توسط غذای مخصوص تغذیه می شدند و آب به میزان نیاز در دسترس آن ها قرار می گرفت. تمامی حیوانات پس از گروه بندی به مدت ۲ هفته به منظور حذف عامل استرس و تنظیم چرخه تاریکی و روشنایی، در شرایط استاندارد نگهداری شدند. برای انجام این تحقیق، ۸۴ قطعه موش سوری ماده در ۶ گروه مختلف تقسیم بندی شدند که این گروه ها عبارت بودند از: گروه کنترل: گروه دریافت کننده سرم فیزیولوژی به صورت خوراکی (گاواژ) به صورت روزانه؛ گروه هایپرآندروژنیسم: گروه دریافت کننده لتروزول با دوز  $2 \text{ mg/kg}$  (ساخت شرکت داروسازی سها)، حل شده در  $0.2$  میلی لیتر آب مقطر به صورت

ایزوفلاونوئیدها به عنوان استروژن های طبیعی در جلوگیری از بیماری های کمبود استروژن موثر است (۲۷). علاوه بر آن فعالیت ۱۱-بتا هیدروکسیژناز ۲ به صورت داخل و خارج آزمایشگاهی توسط گلیسرینیک اسید با ۲ مکانیسم رقابتی مستقیم و جلوگیری از ترجمه این آنزیم بلاک می شود (۲۸). مصرف عصاره شیرین بیان و گلیسرینیک اسید با جلوگیری از فعالیت ۱۱-بتا هیدروکسیژناز ۱ می تواند باعث کاهش چربی در انسان شود. در رابطه با خواص آنتی اکسیدانی شیرین بیان قابل ذکر است که اجزاء اصلی آنتی اکسیدانی شیرین بیان (Licochalcone A, B, C, D) و آکونیتین (Echinatin) در پروکسیداسیون میکروزمال چربی القا شده توسط Fe(III)-AOP/NADPH موثر بوده و شیرین بیان (Licochalcone B, D) فعالیت شدید آنتی اکسیدانی و ضد عفونی سوپراکسید را نشان دادند. از طرفی مشتقات ایزوفلاونی شیرین بیان مانند گلابریدین از پروکسیداسیون چربی در میکروزوم های کبدی رت جلوگیری کردند و عملکردهای میتوکندریال را از استرس های اکسیداتیو محافظت نمودند. به ویژه هیسپاگلآبریدین A (Hispaglabridin A) فعالیت آنتی اکسیدانی قوی را در مقابل پروکسیداسیون القا شدن توسط Fe-ascorbate نشان داد. علاوه بر آن، گلابریدین که یک ایزوفلاون مشتق از شیرین بیان است، به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در مقابل اکسیداسیون LDL در مطالعات داخل آزمایشگاهی و خارج آزمایشگاهی بود. مصرف شیرین بیان یا گلابریدین توسط موش های آترواسکروتیک با نقص آپولیپو پروتئینی به طور قابل توجهی اکسیداسیون LDL و پیشرفت ضایعات آترواسکروتیک را کاهش داد. به نظر می رسد که گلابریدین به علت ۲ مکانیسم دارای این خاصیت است: اول اینکه به LDL باند می شود و از اکسیداسیون آن محافظت می کند. گروه های هیدروکسیل روی حلقه B گلابریدین موثرترین اجزا

گاواژ روزانه؛ گروه هایپرآندروژنیسم و درمان شده توسط عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان با دوز ۱۵۰ mg/kg: گروه دریافت کننده لئروزول با دوز ذکر شده به همراه عصاره ریشه گیاه شیرین بیان با دوز ۱۵۰ mg/kg حل شده در ۰/۴ میلی لیتر آب به صورت گاواژ روزانه؛ گروه هایپرآندروژنیسم و درمان شده توسط عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان با دوز ۳۰۰ mg/kg: گروه دریافت کننده لئروزول با دوز ذکر شده به همراه عصاره ریشه گیاه شیرین بیان با دوز ۳۰۰ mg/kg حل شده در ۰/۴ میلی لیتر آب به صورت گاواژ روزانه؛ گروه هایپرآندروژنیسم و درمان شده توسط عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان با دوز ۴۵۰ mg/kg: گروه دریافت کننده لئروزول با دوز ذکر شده به همراه عصاره ریشه گیاه شیرین بیان با دوز ۴۵۰ mg/kg حل شده در ۰/۴ میلی لیتر آب به صورت گاواژ روزانه؛ گروه درمان شده با دوز ۴۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین بیان: گروه دریافت کننده عصاره ریشه گیاه شیرین بیان تنها، با دوز ۴۵۰ mg/kg حل شده در ۰/۴ میلی لیتر آب به صورت گاواژ روزانه.

تمام گروه ها در دوره زمانی ۲۱ روزه مورد تیمار قرار گرفتند. در ابتدای دوره برای حصول اطمینان از سالم بودن سیکل جنسی اسمیر واژینال به مدت ۴ روز تهیه و با میکروسکوپ بررسی شده و در صورت سالم بودن به صورت تصادفی در گروه ها قرار گرفتند (۲۹). پس از پایان دوره، موش ها جهت انجام لقاح آزمایشگاهی با استفاده از تزریق ۱۰ واحد هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) و ۴۶-۴۸ ساعت بعد تزریق ۱۰ واحد هورمون HCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی لیتر به روش داخل صفاقی آماده شدند. جهت تهیه اسپرم از موش های نر بارور که باروری آن ها قبلاً مورد بررسی قرار گرفته بوده، استفاده شد. پس از تهیه اسپرم دم اپیدیدی و حصول اطمینان از کیفیت

مناسب اسپرم های تهیه شده، بین ۱۲-۱۰ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) موش های ماده با روش آسان کشی با استفاده از تزریق دوز کشنده کتامین بیهوش شدند. پس از استریل کردن ناحیه شکمی و ایجاد برش، لوله های رحمی جدا شده و در داخل محیط کشت ۳۷ درجه از قبل به تعادل رسیده، قرار داده شدند؛ سپس با استفاده از تکنیک Dissecting، تخمک ها خارج شده و بعد از شستشو، به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی BSA ۴ mg/ml منتقل شدند. پس از انجام این کار، اسپرم های متحرک به توانایی رسیده، به تعداد ۱ میلیون به ازای هر میلی لیتر محیط کشت، اضافه شدند. عمل لقاح حدود ۵-۶ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم، با مشاهده دو پیش هسته مشخص می شود. بدین ترتیب، تخمک های بارور شده (زیگوت) به دست آمده و بعد از شستشو به محیط کشت تازه از قبل به تعادل رسیده، در گروه های مختلف مورد مطالعه منتقل شدند. بررسی میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت پس از کشت صورت گرفت. جنین ها از نظر میزان فراگماتاسیون، میزان طی مراحل رشد جنینی یا تعداد جنین های متوقف شده و تیپ بندی جنین های متوقف شده، بررسی شدند. تیپ های جنین های متوقف شده، به این صورت است: تیپ I: جنین های با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل؛ تیپ II: جنین های با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها؛ تیپ III: جنین های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکول سیتوپلاسمیک.

نهایتاً به منظور بررسی درصد لقاح، درصد جنین های ۲ سلولی، درصد بلاستوسیست ها و میزان لیز و فراگماتاسیون جنین ها، از نرم افزار Minitab (Minitab Co., USA) و روش آماری مقایسه نسبت ها با سطح معنی داری  $P > 0.05$  استفاده شد.

## یافته ها:

در بررسی اووسیت های سالم برای لقاح داخل آزمایشگاهی در گروه های دریافت کننده لئروزول و تیمار با دوزهای مختلف، اووسیت های مناسب به صورت معنی داری کمتر از گروه کنترل و تجویز عصاره تنها بود. گروه های تیماری ۱ و ۲ در مقایسه با گروه لئروزول افزایش درصد معنی داری داشتند. گرچه گروه عصاره تنها تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشتند، اما افزایش درصد معنی داری نسبت به سایر گروه ها نشان دادند ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

در بررسی میزان اووسیت های لقاح یافته در گروه های دریافت کننده لئروزول و تیمار ۳، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشتند. گروه های تیماری ۱ و ۲ افزایش درصد معنی داری نسبت به گروه لئروزول داشتند. گروه عصاره تنها افزایش معنی داری نسبت به سایر گروه ها داشت، ولی نسبت به گروه کنترل، این افزایش معنی دار نبود ( $P < 0/05$ ) (تصویر شماره ۲).

در بررسی تعداد رویان های ۲ سلولی در گروه های دریافت کننده لئروزول و تیمارها کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل و دریافت کننده عصاره تنها داشته اند. گرچه هر ۳ گروه تیماری افزایش درصد معنی داری نسبت به گروه لئروزول داشتند. البته گروه عصاره تنها تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

در بررسی تعداد بلاستوسیست ها در گروه دریافت کننده لئروزول بلاستوسیستی وجود نداشت و گروه های تیماری افزایش معنی داری نسبت به گروه لئروزول از خود نشان دادند. در گروه های تیماری کاهش معنی داری در درصد بلاستوسیست ها نسبت به گروه های کنترل و تجویز عصاره تنها مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

در بررسی تعداد رویان های متوقف شده در گروه های مختلف، در گروه دریافت کننده لئروزول رویان ها به طور کامل متوقف شده بودند. در گروه های تیماری با وجود کاهش معنی دار نسبت به گروه لئروزول، افزایش درصد معنی داری در مقایسه با گروه کنترل و عصاره تنها در توقف رویان های مختلف مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

در بررسی کیفیت رویان های متوقف شده از نظر میزان لیز و فراگمانتاسیون، رویان های متوقف شده ی تیپ ۱ در گروه های کنترل و عصاره ی تنها این درصد صفر یا نزدیک به صفر بود، اما بیشتر توقف در این تیپ مربوط به گروه دریافت کننده لئروزول مشاهده شد. گروه های تیماری کاهش معنی داری نسبت به گروه مذکور داشتند. قابل ذکر است که گروه کنترل توقفی در این تیپ مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

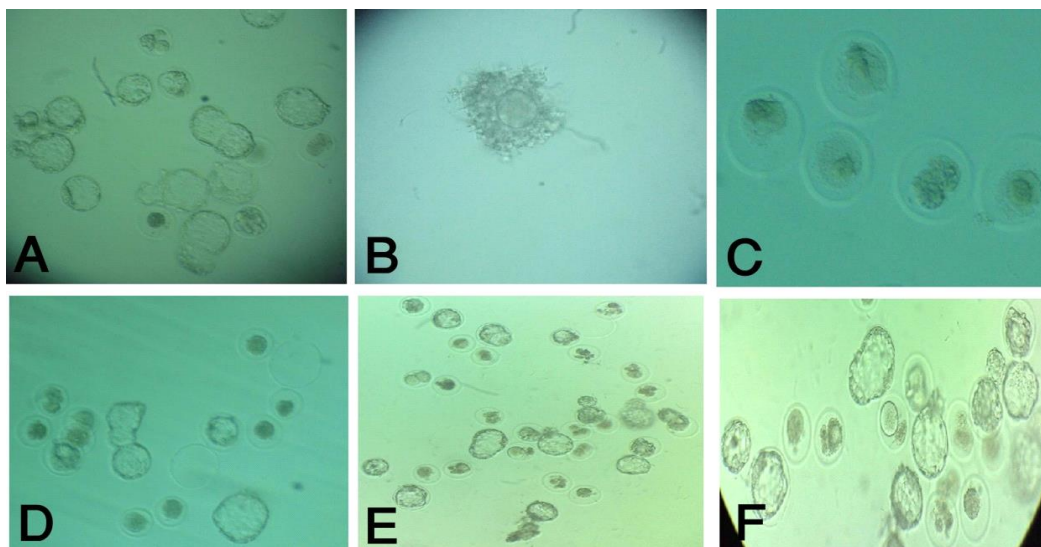
در بررسی رویان های متوقف شده ی تیپ ۲ در گروه های تجویز عصاره ی تنها و کنترل درصد مربوطه بسیار کم بود؛ به طوری که در گروه تجویز عصاره تنها صفر، اما در گروه های دریافت کننده لئروزول و تیماری نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

در بررسی رویان های متوقف شده ی تیپ ۳ در گروه دریافت کننده لئروزول همه ی رویان ها به صورت تیپ های قبلی متوقف شده بودند و رویانی برای این نوع از توقف باقی نمانده بود، اما میزان رویان های متوقف شده، این تیپ در گروه ۳ تیمار به صورت معنی داری کمتر از بقیه بود، در گروه ۲ تیمار افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در گروه تجویز عصاره تنها با وجود تشابه با گروه های کنترل و تیمار ۱ کاهش معنی داری نسبت به گروه تیمار ۲ مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

**جدول شماره ۱: مقایسه و بررسی کیفیت اووسیت، درصد لقاح، روند رشد جنینی و کیفیت جنین های متوقف شده و کیفیت آن ها در گروه های مختلف مورد مطالعه**

گروه	کنترل	لتروزول	لتروزول + ۱۵۰ mg/kg	لتروزول + ۳۰۰ mg/kg	لتروزول + ۴۵۰ mg/kg	شیرین بیان
تعداد	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
حیوان	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
موش تخمک داده	۱۰	۲ a	۳ a	۶ abc	۴ ab	۱۰ bcde
کل اووسیت	۱۳۱	۸	۴۵	۴۸	۱۵	۱۴۷
اووسیت مناسب (درصد)	۱۳۱ (۱۰۰)	۵ a (۶۲/۵)	۴۰ ab (۸۸/۸۸)	۴۲ ab (۸۷/۵)	۱۲ ab (۸۰)	۱۴۷ bcde (۱۰۰)
میزان لقاح (درصد)	۱۲۳ (۹۳/۸۹)	۳ a (۶۲/۵)	۳۳ b (۸۲/۵)	۳۵ b (۸۳/۳۵)	۹ ab (۷۵)	۱۴۴ bcde (۹۷/۹۶)
رویان ۲ سلولی (درصد)	۱۱۲ (۹۱/۰۶)	۱ a (۳۳/۳۳)	۲۴ ab (۷۲/۷۲)	۲۷ b (۷۷/۱۴)	۷ b (۷۷/۷۷)	۱۲۹ ce (۸۹/۵۸)
پلاستوسیت (درصد)	۷۷ (۶۲/۶)	۰ a (۰)	۸ ab (۲۴/۲۴)	۷ ab (۲۰)	۳ ab (۲۹/۲۷)	۹۳ bcde (۶۴/۶)
رویان متوقف شده (درصد)	۴۶ (۳۷/۴)	۳ (۱۰۰)	۲۵ ab (۷۵/۷۵)	۲۸ ab (۸۰)	۶ ab (۶۶/۶۶)	۵۱ bcde (۳۵/۴۱)
تیپ ۱ (درصد)	۰ (۰)	۲ a (۶۶/۶۶)	۳ b (۹/۰۹)	۱ b (۲/۸۵)	۲ ab (۲۲/۲۲)	۱ bce (۰/۶۹)
رویان متوقف شده	۴ (۳/۲۵)	۱ (۳۳/۳۳)	۱۰ ab (۳۰/۰۳)	۸ a (۲۲/۸۶)	۳ a (۳۳/۳۳)	۰ acde (۰)
تیپ ۳ (درصد)	۴۲ (۳۴/۱۵)	۰ a (۰)	۱۲ b (۳۶/۳۶)	۱۹ ab (۵۴/۲۸)	۱ ab (۱۱/۱۱)	۵۰ bde (۳۴/۷۲)

**a** معنی دار بودن گروه مورد نظر نسبت به گروه کنترل، **b** معنی دار بودن گروه مورد نظر نسبت به گروه لتروزول، **c** معنی دار بودن گروه مورد نظر نسبت به گروه تیمار ۱، **d** معنی دار بودن گروه مورد نظر نسبت به گروه تیمار ۲، **e** معنی دار بودن گروه مورد نظر نسبت به گروه تیمار ۳.



**تصویر شماره ۱: اووسیت و رویان ها و بلاستوسیت های مختلف، درشت نمایی ۱۰۰× میکروسکوپ اینورت**

**A** (گروه کنترل) که در آن جنین های متوقف شده و حتی هیچ شده دیده می شوند؛ **B** اووسیت گروه دریافت کننده لتروزول که دارای کیفیت نامناسبی بوده و توده کومولوسی آن کاملاً فشرده (*Compact*) می باشد؛ **C** گروه لتروزول که در آن جنین ها در مراحل اولیه جنینی متوقف شده و درجات بالایی از لیز را نشان می دهند؛ **D** گروه محافظتی ۱۵۰ که تعدادی از جنین ها به مرحله بلاستوسیت رسیده و تعداد زیادی در مراحل مختلف رشد متوقف شده و جنین های متوقف شده دارای لیز و فراگماتاسیون می باشند؛ **E** جنین های گروه تیمار ۲، **F** جنین های گروه عصاره تنها.

## بحث:

اختلالات هورمونی به خصوص در رابطه با اندام های جنسی همواره یکی از مشکلات پزشکی شایع بوده است. از جمله شایع ترین این اختلالات در جنس ماده سندروم تخمدان پلی کیستیک است. این سندروم علائم مختلفی را در فرد بیمار ایجاد می کند که یکی از این اثرات هایپراندروژنیسم می باشد. در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که در زنان با تستوسترون بالا، استرس اکسیداتیو افزایش می یابد (۳۱،۳۰)؛ همچنین نشان داده شده است که هایپرآندروژن سبب کاهش فعالیت SOD، افزایش رایکال های آزاد، آسیب DNA، القای آپوپتوز و آسیب میتوکندریایی می شود (۳۴-۳۱).

اثرات تخریبی رادیکال های آزاد توسط سیستم درون سلولی مانند GSH، ویتامین C و آنزیم هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز مهار می گردد. به نظر می رسد که توان دفاع آنتی اکسیداتیو جنین های آزمایشگاهی در مقاطع مختلف تکوین تا مرحله بلاستوسیست متفاوت باشد. گروهی از محققین معتقدند که ظرفیت اصلی آنتی اکسیدانی جنین ها در مراحل اولیه تقسیمات زیگوت وابسته به ذخیره mRNA مادری به ارث رسیده درون اووسیت است و تدریجاً در مرحله فعالیت ژنوم جنینی است که ژنوم جنین قادر به فعالیت متقابل در مقابل اکسیدان های تولید شده درون سلول و یا محیط کشت باشد (۳۷،۳۵). در *in vivo* به نظر می رسد اووسیت ها و جنین ها در برابر استرس اکسیداتیو به واسطه پاک کننده های اکسیژنی موجود در مایعات فولیکولی و اویداکت محافظت می شوند (۳۶). از طرف دیگر افزایش آندروژن در محیط کشت فولیکول های موش سوری باعث کاهش ظرفیت تقسیم میتوزی اووسیت می گردد. البته افزودن تستوسترون تأثیر منفی بیشتری روی رشد اووسیت و جنین در آزمایشگاه، از آندروژن های (دیگر عضو خانواده ی آندروژن ها) داشته است (۳۸).

در این سندرم به علت افزایش LH و کاهش FSH و به طور کلی عدم تعادل هورمونی، محور هیپو

تالاموسی-هیپوفیزی-تخمدانی دچار مشکل شده و با وجود تحریک به تخمک گذاری توسط PMSG و یا hCG در روند IVF بسیاری از موش ها تخمک گذاری نمی کنند. کیفیت اووسیت های مناسب به دست آمده هم در این گروه کاهش داشته است که علت آن رشد نامتوازن فولیکول و اووسیت و از کار افتادن آنتی اکسیدانت های آنزیمی و غیر آنزیمی و تولید و باقی ماندن ROS است. به طوری که توده ی کومولوسی فشرده در اووسیت های به دست آمده از این گروه مشهود بود. درصد لقاح نیز به علت آسیب وارده به اندامک ها به خصوص شبکه آندوپلاسمی و اختلال در تولید گرانول های قشری پایین آمده است. پیشرفت جنین در فرایند IVF هم کاهش معنی داری در این گروه داشته است که می تواند به علت آسیب وارده به DNA میتوکندریایی و mRNA مادری موجود در اووسیت و عدم توانایی تولید انرژی برای پیشرفت جنین باشد. به طوری که هیچ بلاستوسیستی در این گروه مشاهده نشد.

شیرین بیان با تحریک فعالیت آنزیم آروماتاز و داشتن ترکیبی همانند عملکرد آروماتاز، تبدیل دی هیدرو اپی آندروستندیون به استرادیول را تسهیل می کند (۳۹)؛ همچنین گلیسرینیک اسید (GA) فعال ترین جز شیرین بیان اثر شبه مینرالوکورتیکوئید دارد که این عمل را با بلوکه کردن عمل تیپ ۲ آنزیم بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز انجام می دهد. این آنزیم در کلیه و سایر بافت های پوششی هدف آلدسترون، کورتیزون را به کورتیزول تبدیل می کند؛ همچنین این ماده در دستگاه گوارش فعال تر شده می تواند به ریسپتورهای مینراکورتیکوئیدی به عنوان آگونیست کورتیزون ها نشسته و با مینرالوکورتیکوئیدهای داخل بدن رقابت کند (۲۲،۴۰). شیرین بیان با راهکارهای دیگری هم باعث بهبود عملکرد دستگاه تناسلی می گردد. از جمله با مهار

فعالیت ۱۷ هیدروکسی استروئید دهیدروژناز و ۱۷ و ۲۰ لیاز که همگی در سنتز خانواده آندروژن از پروژسترون نقش دارند (۴۱).

هنوز اثر سینرژیستی گلابریدین و GA در شیرین بیان به صورت جداگانه بررسی نشده است تا معلوم شود، کدام یک موثرتر از دیگری در بهبود باروری هستند. غیر از اثرات هورمونی و اندوکرینی شیرین بیان خاصیت آنتی اکسیدانی آن نیز در درمان هایپرآندروژنیسم به کمک تخمدان و بدن می آید. اثرات درمانی شیرین بیان بر هایپرآندروژنیسم به اینجا ختم نمی شوند. همان طوری که قبلاً اشاره شده هایپرآندروژنیسم تخمدانی و به طبع آن هایپرآندروژنیا باعث از کار افتادن SOD و سایر آنزیم های آنتی اکسیدانتی بدن چون کاتالاز می شود، اما بر فعالیت گلوکوتایون اثر چندانی ندارد؛ همچنین با افزایش آترزی فولیکول ها و پراکسیداسیون زیاد لیپیدهای غشای سلول های آترتیک در تخمدان تجمع رادیکال های آزاد اکسیژن پیش می آید که این امر مشکل را مضاعف می کند (۴۲، ۴۳)، اما شیرین بیان با مواد موثره آنتی اکسیدانتی خود به مقابله می پردازد و اجزای اصلی آن یعنی گلابرن و گلیسیرینیک اسید یا سایر ترکیبات آنتی اکسیدانتی آن هستند که به مقابله با رادیکال های آزاد اکسیژن چون  $H_2O_2$ ، Oo و OHo می پردازند (۴۴).

رادیکال های آزاد اکسیژن سیگنال های مهمی در تنظیم فعالیت فیزیولوژیک تولید مثلی ماده هستند که شامل فولیکولوژنز، بلوغ اووسیت، استروئیدوژنز، عملکرد جسم زرد و لوتئیزه شدن است. البته افزایش افسار گسیخته آن ها در روند پاتولوژیک نقش موثری دارد (۴۴، ۴۵). خود افزایش رادیکال های آزاد نه تنها باعث افزایش آترزی پاتولوژیک می شوند، بلکه فولیکولوژنز را هم متوقف می سازند و روند تخمک گذاری را دچار مشکل می سازند (۴۶).

گروه های تیماری نتایج یکدستی در همه ی پارامترها نداشته اند. مثلاً در گروه تیمار ۲ با وجود افزایش موش های تخمک داده نسبت اووسیت به دست آمده و اووسیت مناسب آن نسبت به تیمار ۱ کمتر بوده است. درمان تنها با شیرین بیان نیز در برخی موارد نتایج بهتری در پی داشته است، اما چرا گروه تیمار ۳، اکثراً نتایجی مشابه تیمار ۱ داشته است، مورد سوال می باشد؛ می توان برای جواب این سوال عملکرد کبد و کلیه را در گروه های این مطالعه و همچنین گروه های تجویزی عصاره تنها با دوزهای ۱۵۰ mg/kg و ۳۰۰ mg/kg مورد بررسی قرار داد یا با اضافه کردن اندازه گیری فاکتورهای دیگری چون FSH، LH و DHEA قسمت های پنهان و ناملموس این تحقیق را آشکار نمود.

### نتیجه گیری:

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که اثرات سوء استفاده از لتروزول پتانسیل کاهش توان باروری در جنس ماده را داشته و استفاده از عصاره هیدروالکلی شیرین بیان با دوز مناسب، به عنوان یک آنتی اکسیدان تا حدودی می تواند اثرات سوء هایپرآندروژنیسم ناشی از سندروم تخمدان پلی کیستیک بر توان باروری موش ماده را بهبود بخشد.

### تشکر و قدردانی:

در پایان از معاونت پژوهشی و همکاران محترم در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و قدردانی صورت می گیرد. مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه شیرین بیان در بهبود باروری موش های سوری با هایپرآندروژنیسم تجربی ایجاد شده توسط لتروزول" در مقطع دکترای حرفه ای با شماره پایان نامه ۱۳۳۴ در سال ۱۳۹۳ می باشد که با حمایت دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه اجرا شده است.



## منابع:

1. Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. *Mol Endocrinol*. 2008; 22(12): 2643-54.
2. Ledger WL. Clinical utility of measurement of anti-mullerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(12): 5144-54.
3. Armanini D, Fiore C, Bielenberg J, Ragazzi E. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) In: Encyclopedia of dietary supplements. Coates PM, Blackman RM, Cragg GM, Levine M, Moss J, White JD (ed). New York: Marcel Dekker Inc; 2005.
4. Diamanti-Kandarakis E, Spritzer PM, Sir-Petermann T, Motta AB. Insulin resistance and polycystic ovary syndrome through life. *Curr Pharm Desdesign*. 2012; 18(34): 5569-76.
5. Armanini D, Castello R, Scaroni C, Bonanni G, Faccini G, Pellati D, et al. Treatment of polycystic ovary syndrome with spironolactone plus licorice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007; 131(1): 61-7.
6. Wang CC, Li L, Tang LY, Leung PC. Safety evaluation of commonly used Chinese herbal medicines during pregnancy in mice. *Hum Reprod*. 2012; 27(8): 2448-56.
7. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Ahmadi A, Shojaei-Saadi HA, Baeri M, Abdollahi M. Molecular mechanisms of a novel selenium-based complementary medicine which confers protection against hyperandrogenism-induced polycystic ovary. *Theriogenology*. 2012; 78(3): 620-31.
8. Mannerås L, Lystig T, Holmång A, Ottosson-Lönn M, Stener-Victorin E. Continuous administration of dihydrotestosterone or letrozole to immature female rats results in polycystic ovary syndrome characteristics at adult age. *Am J Physiol Regul Integr Comp*. 2007; 281(5): 488-501.
9. Nabiuni M, Poyanmanesh F, Karimzadeh L, Nasri S, Nazari Z. Honey bee venom modulates hyperglycemia in response to hyperandrogenism in polycystic ovarian syndrome-induced Wistar rats. *Int Conf Applied Life Sci*. 2012; 12: 235-240.
10. Ried K, Stuart K. Efficacy of traditional Chinese herbal medicine in the management of female infertility: a systematic review. *Complement Ther Med*. 2011; 19(6): 319-31.
11. Ma RJ, Zhou J, Fang JQ, Yang DH, Qu F. Combination of acupuncture and chinese medicinal herbs in treating model rats with polycystic ovary syndrome. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011; 8(4): 353-61.
12. Yu L, Liao Y, Wu H, Zhao J, Wu L, Shi Y, et al. Effects of electroacupuncture and Chinese kidney-nourishing medicine on polycystic ovary syndrome in obese patients. *J Tradit Chin Med*. 2013; 33(3): 287-93.
13. Isbrucker RA, Burdock GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*. 2006; 46(3): 167-92.
14. Simons R, Vincken JP, Mol LA, The SA, Bovee TF, Lujendijk TJ, et al. Agonistic and antagonistic estrogens in licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Anal Bioanal Chem*. 2011; 401(1): 305-13.
15. Omar HR, Komarova I, El-Ghonemi M, Fathy A, Rashad R, Abdelmalak HD, et al. Licorice abuse: time to send a warning message. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2012; 3(4): 125-38.
16. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(5): 341-54.

17. Sioufi A, Gauducheau N, Pineau V, Marfil F, Jaouen A, Cardot JM, et al. Absolute bioavailability of letrozole in healthy postmenopausal women. *Biopharm Drug Dispos*. 1997; 18(9): 779-89.
18. Miller WR, Dixon JM, Macfarlane L, Cameron D, Anderson TJ. Pathological features of breast cancer response following neoadjuvant treatment with either letrozole or tamoxifen. *Eur J Cancer*. 2003; 39(4): 462-8.
19. Elisaf MS, Bairaktari ET, Nicolaides C, Kakaidi B, Tzallas CS, Katsaraki A, et al. Effect of letrozole on the lipid profile in postmenopausal women with breast cancer. *Eur J Cancer*. 2001; 37(12): 1510-3.
20. Tiboni GM, Marotta F, Rossi C, Giampietro F. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on in utero development in rats. *Hum Reprod*. 2008; 23(8): 1719-23.
21. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res*. 2008; 22(6): 709-24.
22. Armanini D, Bonanni G, Palermo M. Reduction of serum testosterone in men by licorice. *N Engl J Med*. 1999; 341(15): 1158.
23. Armanini D, Fiore C, Mattarello M, Bielenberg J, Palermo M. History of the endocrine effects of licorice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002; 110(6): 257-61.
24. Armanini D, Mattarello MJ, Fiore C, Bonanni G, Scaroni C, Sartorato P, et al. Licorice reduces serum testosterone in healthy women. *Steroids*. 2004; 69(11-12): 763-6.
25. Yaginuma T, Izumi R, Yasui H, Arai T, Kawabata M. Effect of traditional herbal medicine on serum testosterone levels and its induction of regular ovulation in hyperandrogenic and oligomenorrheic women (author's transl). *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 1982; 34(7): 939-44.
26. Jungbauer A, Medjakovic S. Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013; 68(2): 222-31.
27. Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Izrael S, Vaya J. Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 78(3): 291-8.
28. Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Celio L, Longarini R, La Torre I, et al. Could exemestane affect insulin-like growth factors, interleukin 6 and bone metabolism in postmenopausal advanced breast cancer patients after failure on aminoglutethimide, anastrozole or letrozole? *Int J Oncol*. 2003; 22(5): 1081-9.
29. Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res*. 2004; 35(2): 103-8.
30. Al-Kataan M, Ibrahim M, Al-Jammas M, Shareef Y, Sulaiman M. Serum antioxidant vitamins changes in women with Polycystic Ovarian Syndrome. *J Bahrain Med Soc*. 2010; 22(2): 68-71.
31. Hilali N, Vural M, Camuzcuoglu H, Camuzcuoglu A, Aksoy N. Increased prolidase activity and oxidative stress in PCOS. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013; 79(1): 105-10.
32. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001; 7(2): 175-89.
33. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev*. 1991; 28(4): 356-60.
34. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(3-4): 463-71.
35. Taanman JW, Schrage C, Bokma E, Reuvekamp P, Agsteribbe E, De Vries H. Nucleotide sequence of the last exon of the gene for human cytochrome c oxidase subunit VIb and its flanking regions. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1089(2): 283-5.

36. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod.* 1998; 13(4): 998-1002.
37. Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 13-20.
38. Romero S, Smitz J. Exposing cultured mouse ovarian follicles under increased gonadotropin tonus to aromatizable androgens influences the steroid balance and reduces oocyte meiotic capacity. *Endocrine.* 2010; 38(2): 243-53.
39. Sakamoto K, Wakabayashi K. Inhibitory effect of glycyrrhetic acid on testosterone production in rat gonads. *Endocrinol Jpn.* 1988; 35(2): 333-42.
40. Armanini D, Kuhnle U, Strasser T, Dorr H, Butenandt I, Weber PC, et al. Aldosterone-receptor deficiency in pseudohypoaldosteronism. *N Engl J Med.* 1985; 313(19): 1178-81.
41. Belinky PA, Aviram M, Mahmood S, Vaya J. Structural aspects of the inhibitory effect of glabridin on LDL oxidation. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(9): 1419-29 .
42. Vakilian K, Ranjbar A, Zarganjfard A, Mortazavi M, Vosough-Ghanbari S, Mashaiee S, et al. On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. *Toxicol Mech Methods.* 2009; 19(2): 94-9.
43. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009; 21(3): 219-22 .
44. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Review Article: Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* 2008; 59(1): 2-11.
45. Agarwal A. Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility. In: Armand B, Christophe R, Stephanie R, Vriese D. *Male fertility and lipid metabolism.* Champaign, Illinois: AOCS Pub; 2003; 157-83.
46. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril.* 2008; 90(2): 247-57.

## Effect of *Licorice* root hydroalcoholic extract to improve the quality of fertility in hyperandrogenism- induced polycystic ovary syndrome by letrozole in mice

Ahmadi A<sup>\*</sup>, Mostafavi M

Basic Sciences Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 31/Des/2015 Accepted: 28/Jan/2016

**Background and aims:** Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women. This syndrome symptom of androgens, anovulation, infertility and obesity is determined. The important symptoms for polycystic ovary syndrome, is the increasing of blood androgen. This study was aimed to investigate the effect of *Licorice* root hydroalcoholic extract on hyperandrogenism complications caused by experimental polycystic ovarian on fertility ability of female mice.

**Methods:** In this study, 84 mice were divided in 6 groups: control group, experimental group that Hyperandrogenism (HA) was induced by oral administration of 2mg/kg letrozole and protective effects of licorice root were studied in three doses: 150, 300, 450 mg/kg by gavage for 21 consecutive days. The sixth group was administrated by 450 mg/kg licorice extract alone. The treatment groups received licorice extract with noted doses in oral administration after 2 hours. At the end of the treatment period, 10 rats from each group were randomly chosen for in vitro fertilization. In the process of in vitro fertilization of the oocytes, the rate of embryos, blastocysts and stopping the fertilization was compared between different groups.

**Results:** Comparing the results of different groups showed that fertilization factors in the hyperandrogenism group decreased very much and licorice extract could have relative protective effects. These effects were higher in the treatment group 2.

**Conclusions:** Finally, it can be concluded that the adverse effects of letrozole have the potential to reduce female fertility and the use of appropriate doses of licorice extract as an antioxidant could reduce somewhat adverse effects of hyperandrogenism resulted of polycystic ovary syndrome on the fertility of female mice.

**Keywords:** Polycystic ovary syndrome; Fertility; Hyperandrogenism; Letrozole; *Licorice* root.

**Cite this article as:** Ahmadi A, Mostafavi M. Effect of *licorice* root hydroalcoholic extract to improve the quality of fertility in hyperandrogenism- induced polycystic ovary syndrome by letrozole in mice. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(Suppl): 1-12.

---

**\*Corresponding author:**

Basic Sciences Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran. Tel: 00989141498524,  
E-mail: ahmadiabbas36@yahoo.com